

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06540

研究課題名(和文)細胞結合ネットワークの構築による人工細胞モデルの組織化と集団動態発現

研究課題名(英文)Organization of artificial cells into an assembled model that can express orchestrated dynamic behavior through cell junction networks

研究代表者

湊元 幹太(Tsumoto, Kanta)

三重大学・工学研究科・教授

研究者番号：80362359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の遂行のため基本技術の改良として1)逆相遠心法で大量調製したGUVへのバキュロウイルス出芽粒子(BV)の膜融合をレーザー共焦点顕微鏡で観察し融合効率が向上する溶媒選択、脂質組成を検討し、特にPEが補助因子として働くことを見出し、球状固体粒子(シリカビーズ)膜担持形成で得た球状支持調製への組換えタンパク質導入を解析した。2)細胞接着関連タンパク質を膜へ導入に資するため、BV保存法の解析、組換えFERMタンパク質(RDX)のBVとの挙動を解析した。3)細胞接着タンパク質によるGUV集積機能の発現を確認した。最後に4)水性二相系微小液滴に細胞骨格(アクチン)等の取込(分配)挙動を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞はとてもよくできたシステムであるが、設計者はいない。生命の起源からあと、自然に出来てきたものである。現代の細胞、その集まりがもつ仕組みに学んで、何とか、それに近い構造機能の一部でも実現した「人工細胞」が作れないか、という研究は、細胞の持つ生命機能を切り取り際立たせるという意味では、メディカルライフサイエンスに資する発明の基礎にもなりうる。本研究では、細胞接着分子や細胞骨格を導入し、巨大リポソーム(Giant Unilamellar Vesicles; GUVs)等をベースに人工細胞モデル構築を試みた。

研究成果の概要(英文)：To achieve the constitution of artificial cell assemblies, we've basically investigated the following experimental concerns. 1) Membrane fusion between baculovirus budded virions (BVs) and GUVs prepared using the reverse-phase/centrifugation method were analyzed and phosphatidylethanolamine was found to serve as cofactor promoting the fusion. We developed lipid-membrane coated silica microbeads containing recombinant proteins introduced by BVs. 2) Expression of cell adhesion proteins and FERM proteins on BVs were investigated. 3) GUV assembly were able to be induced by the aforesaid adhesive proteins. 4) Aqueous/aqueous microdroplets in an aqueous two-phase system (ATPS) could be used for an efficient vessel concentrating cytoskeletal proteins.

研究分野：Molecular Bioengineering

キーワード：人工細胞 リポソーム GUV 細胞骨格 細胞接着 バキュロウイルス 脂質二分子膜 マイクロコンパートメント

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

人工細胞の構築技術の研究が盛んとなり、細胞の持つ構造・機能のいくつかを選択的に再構築していくようなことが可能となってきた。細胞内の酵素反応を内容したような人工細胞小胞(ベシクル)や、階層的な内部構造を保持したそれなどがある。また、細胞膜のモデルである脂質二分子膜だけでなく、その内部、特に直下の細胞骨格等を封じ込めるなどして、形態変化との関連性を見る研究も多くなされてきており、それらの知見が交わって、生物機能や生物様挙動を発現する人工細胞研究が展開されつつあった。

いっぽう、細胞構造にみられるような微小区画構造(マイクロコンパートメント)としては、従来、前記の脂質二分子膜小胞(ベシクル)構造が一般的と考えられていたが、近年、もう一つの重要な細胞の区画様式として、液-液相分離により生じる液滴構造が注目されてきた。脂質二分子膜に覆われない、非膜小器官(無膜小器官、Membraneless Organelle)がそれにあたる。実際の細胞の構造を形成する様式についての研究知見が世界的に深まったため、細胞の構造・機能・挙動の一部を模倣した、細胞模倣素材を作ることを目指す、多彩な研究が展開されつつあった。

### 2. 研究の目的

私たちは、主に、リン脂質二分子膜から成る人工小胞(ベシクル)であるリポソームを用いて、このような単一の人工細胞モデルを作る研究に携わってきたが、リポソームをベースとした細胞の構造・機能・挙動の模倣を、さらに発展したいと考え、本研究では「細胞結合ネットワークの構築による人工細胞モデルの組織化と集団動態発現」を実演することを大きな狙いとして提案した。

その実現のために、まず、組換えバキュロウイルス-リポソーム膜融合法と新規の巨大リポソーム(Giant Unilamellar Vesicle, GUV)大量調製法に関連する基盤技術や手法(Nishigami M, Tsumoto K, et al., Colloids Surf B 155 (2017) 248; Tsumoto K, et al., Colloids Surf A 546 (2018) 74 等)のさらなる改良を、主な目標として進めながら、リポソームの集積化を試みていくこととした。

上述のように、細胞の微小区画構造の生成様式として水性の液-液相分離による液滴構造形成が注目されてきていた。私たちは、幸いにも、新しい微小区画様式の微小液滴構造に関する研究知見も持ち得ていたので(Tsumoto K, Takiguchi K, et al., Biophys Rev 12 (2020) 425 等)、本研究課題に関連する事項として、当該知見も取り込んで進めることができた。

### 3. 研究の方法

本研究に取り組むため、つぎのことに取り組んだ。

#### 1) 脂質二分子膜ベシクル(GUVs)調製の検討

・逆相遠心法(Reverse-Phase/Centrifugation Method)による20 μmの直径を持つGUVの大量調製し、蛍光標識したバキュロウイルス出芽粒子(BV)と膜融合させ、レーザー共焦点顕微鏡等で観察することにより、融合効率が向上する溶媒選択、脂質組成を検討した。脂質組成条件については、別の調製法で作製した多重層リポソーム(Multilamellar Vesicles, MLVs)でも検証した。

・脂質二分子膜補強のための球状固体粒子(シリカビーズ)への膜担持形成により得た球状支持調製と組換えタンパク質の導入について検討した。

#### 2) バキュロウイルス出芽粒子(BV)による組換え膜タンパク質再構成技術の改善

・細胞接着関連タンパク質を膜へ導入する方法として、回収した組換えBV粒子の保管条件の検討を、凍結保存を基本に検討した。

・細胞骨格と細胞接着分子を連絡する分子であるFERMドメインを持ったERMファミリーに属するタンパク質の組換え遺伝子を作成し、BV-Sf9細胞(宿主細胞)系で発現させ、細胞局在やBV粒子への搭載を検討した。

#### 3) 細胞接着タンパク質によるGUV集積機能の発現に関する検討

・細胞接着分子の組換え体を発現するBVとGUVを膜融合し、組換えタンパク質の機能発現がGUV上で見られるかを検討した。

#### 4) 水性二相系による微小液滴形成と細胞骨格タンパク質の分配に関する検討

・水溶性高分子ポリエチレングリコール(PEG)とデキストラン(DEX)からなる水性二相系で生じる微小液滴を細胞様のマイクロコンパートメントのモデルとして用いて、細胞骨格(アクチン)等の取込(分配)挙動を検討した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 脂質二分子膜ベシクル (GUVs) 調製の検討

・逆相遠心法を用いることで 20  $\mu\text{m}$  の直径を持つ GUV を一般的な緩衝液中で調製することができる。私たちが開発した当初の方法ではリン脂質を溶解する溶媒としてジエチルエーテルを用いているが、リポソーム懸濁液中の残溶媒の影響により BV との膜融合の効率がこの場合著しく低下する問題があった。BV とリポソームの膜融合には、受入れ側リポソーム膜に酸性リン脂質 (Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylserine (PS), Phosphatidic acid (PA) 等) が含まれることと弱酸性条件 (pH ~4.0-5.5) に曝されることが必要である。Octadecyl Rhodamine B chloride (R18) によりエンベロープ膜を蛍光標識した BV と逆相遠心法で調製した、Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) と DOPS を GUV とを膜融合させ、レーザー共焦点顕微鏡で GUV 膜への蛍光標識の移行を観察した。このとき、上記 2 脂質に加えて phosphatidylethanolamine (DOPE) が存在すると、膜融合効率が上がり、PE が BV-GUV 膜融合の補助因子として働くことが分かった [図 1]。別の調製法で作製した多重層リポソーム (Multilamellar Vesicles, MLVs) でも検証し同様の傾向が認められた。現在、さらに検討を進めている。

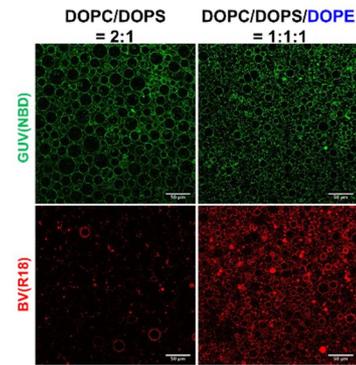


図 1. BV-GUV 膜融合の脂質組成依存性

・GUV の脆弱性を補完するため、球状固体粒子 (シリカビーズ) への膜担持形成により脂質二分子膜を補強した球状支持二分子膜 (Spherical Supported Lipid Bilayer Membrane, SS-BLM) の調製方法の検討と、担持膜へのタンパク質導入の詳細を検討した。支持膜上に提示した組換えタンパク質を抗原とする抗原-抗体反応が特異的に起こることが既に分かっていたが、今回、共焦点顕微鏡を用いて、担持膜へ膜融合により個別に挿入された、蛍光タグタンパク質が融合された複数の組換えタンパク質サブユニット間で、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が起こっていることを見出し、担持膜上でヘテロなタンパク質間の相互作用が起こっていることを確認した。

##### 2) バキュロウイルス出芽粒子 (BV) による組換え膜タンパク質再構成技術の改善

・組換え BV 粒子を R18 標識し、酸性脂質を含むリポソームとの膜融合による解析を用いて、凍結保存条件に関する検討を行った。BV 粒子の保存を、氷上保存、凍結保存 (-80  $^{\circ}\text{C}$ )、トレハロース共存下の凍結保存 (-80  $^{\circ}\text{C}$ ) の 3 通りで行った後、MLV との融合実験を行った。凍結保存した BV については、凍結融解操作を 1, 2, 3, または 4 回行ったものを用意した。膜融合能は、トレハロース無添加で凍結保存した BV では、2 回目以降失活した。トレハロースを含んだ懸濁液で凍結保存した BV は、4 回目まで、氷上保存と同様の融合効率を示した [図 2]。段階希釈した BV の Sf9 細胞への感染実験から、感染能についても同様の傾向が認められた。さらに、各 BV のネガティブ染色による透過電子顕微鏡観察の結果から、正常な形態を保持したウイルス粒子の量と、上記の挙動が良く相関した。このことから、本研究の遂行に資する保存状態を見出せた (詳細は Nakanishi K, Tsumoto K, et al. Biosci Biotechnol Biochem 84(2020)686 で報告)。

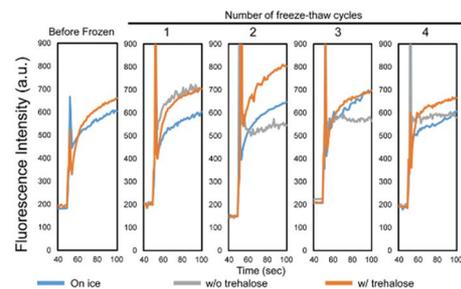


図 2. BV 凍結保存条件による凍結融解効果の膜融合能への影響

・細胞膜と細胞骨格を繋ぐアダプタータンパク質で膜結合型 FERM ドメインをもつヒト Radixin (RDX) の組換え遺伝子を作成し、BV-Sf9 細胞 (宿主細胞) 系で発現させ、細胞局在や BV 粒子への搭載を検討した。組換え BV を含む感染 Sf9 細胞の培養上清から、超遠心分離、シヨ糖密度勾配遠心、各画分の再度の超遠心分離により BV ペレットを得た。懸濁液を抗ウイルス由来 GP64 抗体と抗 RDX 抗体でウエスタンブロット (WB) した。正常 BV の存在を示すヌクレオカプシドタンパク質 VP39 を SDS-PAGE で確かめた。その結果、RDX は膜貫通タンパク質でないが、その遺伝子だけの発現だが、正常 BV と RDX は、同一画分に含まれていて、BV エンベロープとともにふるまっていることが分かった。RDX の BV への取込過程と局在をさらに確かめるため、RDX の C 末端に蛍光タグ RFP (赤色蛍光タンパク質) を繋げた融合遺伝子と、それより RDX の N 末端側にある膜結合 FERM ドメイン (2-316 アミノ酸領域) を欠損させた RDX (RDX 316-RFP) の遺伝子を、それぞれ組み込んだ組換えウイルスを作成し、BV への搭載、感染 Sf9 細胞での発現パターンについて調べた。FERM の有無により宿主細胞の膜近傍での発現パターンが異なることが観察され、BV 搭載の挙動の違いと関係すると思われる。現在、さらに検討を進めている。

##### 3) 細胞接着タンパク質による GUV 集積機能の発現に関する検討

・細胞接着分子 (Cell Adhesion Molecule 1 (CADM1), ならびに Cadherin (CDH)) の組換えタンパク質を搭載した BV と GUV を膜融合し、GUV 間の接着挙動の有無を、共焦点顕微鏡で観察した。

GUV 接着が、膜へ導入した組換え膜タンパク質の機能が特異的に発現した結果であることを、GUV 画像の真円度・円形度を評価して、接着タンパク質の発現が無い BV を用いた実験との対照で見出した。現在、さらに検討を進めている。

#### 4) 水性二相系による微小液滴形成と細胞骨格タンパク質の分配に関する検討

・水溶性高分子ポリエチレングリコール (PEG) とデキストラン (DEX) からなる水性二相系 (Aqueous Two-Phase System, ATPS) で微小液滴 (マイクロ液滴) を調製し細胞骨格の導入を検討した。PEG/DEX ミクロ液滴 (microdroplet) は、以前の研究から G-アクチンと F-アクチンの分配挙動の観察から分子のサイズや特性によって液滴の分配場所 (局在場所) が異なることが分かっている (Nakatani N, Takiguchi K, Tsumoto K, et al., ChemBioChem 19 (2018) 1370)。今回、二本鎖 DNA とリン脂質について調べたところ、それぞれ液滴の内部と界面に局在することが示された。また、高い分配効率で内封された細胞骨格 (F-アクチン) が、マイクロ液滴に取り込まれ、共存させた特異的切断因子からその場で作用を受けることが示され、細胞骨格と液滴の形態がダイナミックに変化する様子が観察された。ATPS ミクロ液滴が脂質と細胞骨格を優先的に引き込む容器として本研究課題の今後に応用できることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Waizumi Tatsuyuki, Sakuta Hiroki, Hayashi Masahito, Tsumoto Kanta, Takiguchi Kingo, Yoshikawa Kenichi	4. 巻 155
2. 論文標題 Polymerization/depolymerization of actin cooperates with the morphology and stability of cell-sized droplets generated in a polymer solution under a depletion effect	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 075101 ~ 075101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0055460	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakuta Hiroki, Fujita Fumika, Hamada Tsutomu, Hayashi Masahito, Takiguchi Kingo, Tsumoto Kanta, Yoshikawa Kenichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Self Emergent Protocells Generated in an Aqueous Solution with Binary Macromolecules through Liquid-Liquid Phase Separation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 3323-3328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202000344	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 湊元幹太	4. 巻 71(4)
2. 論文標題 水性ミクロ相分離: バイオケミカルリアクターへの利用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学工業	6. 最初と最後の頁 242-246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakanishi Kohei, Tomita Masahiro, Tsumoto Kanta	4. 巻 84
2. 論文標題 Membrane fusion and infection abilities of baculovirus virions are preserved during freezing and thawing in the presence of trehalose	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 686 ~ 694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1704396	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 K. Tsumoto, R. Ito, S. Nishio, Y. Uno, H. Kawakatsu
2. 発表標題 Baculovirus budded virions: protein delivery carriers and model enveloped viruses
3. 学会等名 14th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩田 典也, 富田 昌弘, 湊元 幹太
2. 発表標題 遺伝子組換えバキュロウイルスを用いた酵素担持粒子の開発
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川勝 響, 伊藤 諒, 湊元 幹太
2. 発表標題 リボソームモデル膜融合によるエンベロープウイルス感染能阻害条件の検討
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kanta Tsumoto
2. 発表標題 Membraneless test tubes: microcompartmentalization for model wet experiments using aqueous micro phase-separation
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤諒, 中西航平, 富田昌弘, 湊元幹太
2. 発表標題 組換えバキュロウイルス出芽粒子-リポソーム膜融合によるプロテオGUV形成はホスファチジルエタノールアミンが促進する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kanta Tsumoto, Kohei Nakanishi, Seiwa Nishio, Masahiro Tomita
2. 発表標題 Artificial membranes presenting membrane proteins delivered by recombinant baculovirus particles
3. 学会等名 The 7th China-Japan Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiwa Nishio, Kohei Nakanishi, Yushi Isozaki, Masahiro Tomita, Kanta Tsumoto
2. 発表標題 Development of microbead-supported proteoliposomes with recombinant membrane receptors using a baculovirus gene expression system
3. 学会等名 OKINAWA COLLOIDS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 児島涼太, 渋谷朋, 住野豊, 田中駿介, 林真人, 瀧口金吾
2. 発表標題 リン脂質とアクチンとビーズの互いに結合しないもの同士によるリポソームの形態形成
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 児島涼太、伊藤萌香、田中駿介、瀧口金吾、渋谷朋、住野豊、林真人
2. 発表標題 リン脂質とアクチンとピーズの互いに結合しないもの同士の協働によるリボソームの形態形成
3. 学会等名 第9回ソフトマター研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 湊元幹太、ジンチェンコ アナトーリ	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 402
3. 書名 42 細胞様構造と相分離：モデル実験によるアプローチ In：相分離生物学の全貌（現代化学増刊46） 白木賢太郎 編	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	瀧口 金吾  (Takiguchi Kingo)  (20262842)	名古屋大学・理学研究科・講師   (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------